

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 18 日 (18.08.2005)

PCT

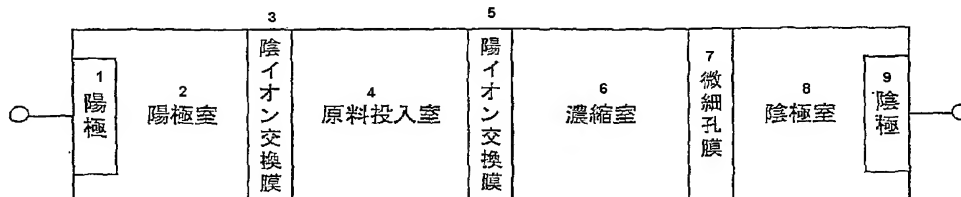
(10) 国際公開番号
WO 2005/075500 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 1/24, 14/79, A23J 1/20, 3/08, B01D 61/46, C02F 1/46
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001732
- (22) 国際出願日: 2005 年 1 月 31 日 (31.01.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-026689 2004 年 2 月 3 日 (03.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町67番地 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井上 浩義 (INOUE, Hiroyoshi) [JP/JP]; 〒8300017 福岡県久留米市日吉町 1 番地 1 アーバンパレス久留米センターステージ302 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 南條 博道 (NANJO, Hiromichi); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満 3 丁目 2 番 9 号 翁ビル 5 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING/REFINING CATIONIC PROTEIN

(54) 発明の名称: 陽イオン性タンパク質の分離精製方法



- 1... POSITIVE ELECTRODE
2... POSITIVE ELECTRODE CHAMBER
3... ANIONIC ION EXCHANGE MEMBRANE
4... MATERIAL INPUT CHAMBER
5... CATIONIC ION EXCHANGE MEMBRANE
6... CONDENSATION CHAMBER
7... MICRO POROUS MEMBRANE
8... NEGATIVE ELECTRODE CHAMBER
9... NEGATIVE ELECTRODE

(57) Abstract: A method for separating/refining cationic protein employing an electrodialysis apparatus. The electrodialysis apparatus is provided with an electrodialysis bath having a positive electrode and a negative electrode, and the electrodialysis bath has a positive electrode chamber, a material input chamber, a condensation chamber, and a negative electrode chamber sequentially from the positive electrode side. The positive electrode chamber and the material input chamber are partitioned by a porous membrane to which an anionic ion exchange group is introduced, the material input chamber and the condensation chamber are partitioned by a porous membrane to which a cationic ion exchange group is introduced, and the condensation chamber and the negative electrode chamber are partitioned by a micro porous membrane. The method using the electrodialysis apparatus (1) comprises a step of inputting an aqueous solution containing cationic protein into the material input chamber and inputting an electrolytic solution into the positive electrode chamber, the condensation chamber and the negative electrode chamber, (2) a step of supplying a current to the electrodialysis apparatus, and (3) a step of collecting the solution containing cationic protein from the condensation chamber.

(57) 要約: 本発明の陽イオン性タンパク質を分離精製する方法は、電気透析装置を用いて行われる。ここで用いる電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極

[続葉有]



WO 2005/075500 A1



SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。本発明の方法は、この電気透析装置において、(1) 該原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、(2) 該電気透析装置に電流を負荷する工程、および(3) 該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する。

明 細 書

陽イオン性タンパク質の分離精製方法

5 技術分野

本発明は、陽イオン性タンパク質、特にラクトフェリンの分離精製方法に関する。

背景技術

10 ラクトフェリンは、分子量約80,000の鉄結合性の糖タンパク質であり、1分子中に2個の鉄を結合している。ラクトフェリンは、多くの哺乳動物の体液中、例えば、乳汁中に存在する。特に、母乳の初乳には、5～10 g/Lのラクトフェリンが含まれ、初乳に含有されている全タンパク質の30%～70%を占めることが知られている。ラクトフェリンは、乳児の健康
15 維持および発育に重要なタンパク質であると共に、近年、抗菌作用および抗バクテリア作用を有することが明らかになり、食品工業の他、様々な分野で利用されている。

ラクトフェリンは、一般に、初乳、常乳、チーズホエイ（チーズ製造時に生じる残渣）などから抽出されている（例えば、富田守、MRC News 21、1998年、247頁および富田守、Foods Food Ingredients J. Jpn、181巻、1999年、33-41頁）。pHが約6であるチーズホエイ中では、ラクトフェリンは陽イオン性であるのに対して、他のタンパク質の大部分は陰イオン性であるため、この性質の違いが抽出に利用されている。例えば、富田守、MRC News 21、1998年、247頁には、ホエイと陽イオン交換樹脂とを接触させて陽イオン交換
20 樹脂にラクトフェリンを吸着させ、この樹脂を高濃度塩類溶液で洗浄してラクトフェリンを脱離させ、次いでこのラクトフェリンを含む脱離液を限外濾

過により脱塩して、ラクトフェリン濃縮物を得ることが記載されている。しかし、この方法では、工程が多く効率的ではない。さらにイオン交換樹脂の再生などの作業も煩雑である。

その他にも、種々のラクトフェリンの分離精製方法が検討されている。例えば、Clovis K. ChiuおよびMark R. Etzel、Journal of Food Science、62巻、5号、1997年、996-1001頁には、陽イオン交換性セルロース膜を用いた単純拡散方法によって、チーズホエイからラクトフェリンを分離する方法が記載されている。しかし、この方法は、分離に時間がかかり効率的でない。また、電気泳動による分離方法（Hurly WLら、J Dairy Sci、76巻、1993年、377頁）、アフィニティークロマトグラフによる分離方法（M. K. WalshおよびS. H. Nam、Prep. Biochem. Biotechnol.、31巻、3号、2001年、229-240頁）、キャピラリー電気泳動による分離方法（Peter Riechelら、Journal of Chromatography A、817巻、1998年、187-193頁）なども検討されている。しかし、これらの方法はいずれも、研究室レベルの少量のラクトフェリンの分離精製方法であり、未だ実用化されていない。

発明の開示

本発明は、ラクトフェリンのような陽イオン性タンパク質を変性させることなく、簡便に分離精製する方法を提供することを目的とする。

本発明は、電気透析装置を用いて、陽イオン性タンパク質を分離精製する方法を提供し、該電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られており、そして該方法は、（１）該原料投入室に陽イオン性タンパク質含

有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、（２）該電気透析装置に電流を負荷する工程、および（３）該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する。

5 好ましい実施態様においては、上記陽イオン性タンパク質は、ラクトフェリンである。

好ましい実施態様においては、上記電流の電流密度は $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である。

10 好ましい実施態様においては、上記（１）の工程において、前記原料投入室にさらに陰イオン交換体またはキレート化剤が添加される。

好ましい実施態様においては、上記陽イオン交換膜の原料投入室側の面が、陰イオン交換膜で被膜されている。

15 本発明の方法によれば、陽イオン性タンパク質、特にラクトフェリンを、変性させることなく、電気透析を行う工程のみで簡便に分離精製することができる。

図面の簡単な説明

図１は、本発明に用いられる電気透析装置における電気透析槽の模式図である。

20 図２は、各溶液についてのＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動の写真である。

図３は、実施例３において陽イオン交換膜を装着した電気透析装置の模式図である。

25 図４は、ホエイ送液速度とラクトフェリン濃縮相送液速度との速度差と、得られたラクトフェリンの収率および純度との関係を示すグラフである。

図５、原液であるホエイおよび送液速度差（ホエイ送液速度－ラクトフェ

リン濃縮相送液速度) ー 5 mL/分の処理によって得られたラクトフェリン濃縮相のHPLC溶出パターン図である。

発明を実施するための最良の形態

5 (本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法の原理)

本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法は、特定の電気透析装置を用いて行われる。この電気透析装置は、例えば、図1に示すような電気透析槽を備え、該電気透析槽が、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜（以下、陰イオン交換膜という場合がある）で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜（以下、陽イオン交換膜という場合がある）で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。本発明の方法では、この電気透析装置の原料投入室に、陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、そして陽極室、濃縮室、および陰極室に電解質溶液を投入した後、電極間に電流を負荷する。これによって、原料投入室中の陽イオン性タンパク質および陽イオン（金属イオン）は、陽イオン交換膜を透過して濃縮室に移行し、一方、陰イオン性タンパク質および陰イオンは、陰イオン交換膜を透過して陽極室に移行する。さらに、濃縮室に移行した陽イオン性タンパク質と陽イオンのうち、陽イオンおよび分子サイズが小さい陽イオン性タンパク質のみが微細孔膜を透過して陰極室に移行する。このとき、目的の陽イオン性タンパク質は分子サイズが大きいため、微細孔膜を透過できない。その結果、目的の陽イオン性タンパク質は、濃縮室中に濃縮される。

(陽イオン性タンパク質含有水性溶液)

25 本発明の方法によって分離精製可能な陽イオン性タンパク質は、所定のpHの水性溶液中において陽イオン性を呈するタンパク質である。本発明にお

いては、高い等電点を有する陽イオン性タンパク質が好ましい。例えば、pHが7において陽イオン性を呈するタンパク質としては、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、ピルビン酸キナーゼ、アルドラーゼ、ヘモグロビン、3-ホスホグリセリン酸ホスホキナーゼ、キモトリプシンA、トリプシノーゲン、ミオグロビン、リゾチーム、シトクロムなどが挙げられる。好ましくは、ラクトフェリンである。

本発明に用いられる陽イオン性タンパク質含有水性溶液は、上記の陽イオン性タンパク質が含有されていれば、特に限定されない。例えば、ラクトフェリンを含有する水性溶液としては、乳汁（例えば、牛乳）などの哺乳動物の分泌液；脱脂乳、ホエイなどの乳汁加工物；微生物（ラクトフェリン遺伝子組換え菌を含む）または細胞の培養液または細胞破碎上清などが挙げられる。ラクトフェリンを大量に含有し、かつ容易に入手可能な点で、牛乳およびホエイが好適であり、廃棄物利用の点から、ホエイがより好適である。

上記陽イオン性タンパク質含有水性溶液のpHは、分離精製する陽イオン性タンパク質が陽イオン性を呈するように、該タンパク質の等電点以下となるように適宜調節され得る。例えば、ラクトフェリンを分離精製する場合、該水性溶液のpHは、通常、7.5以下、好ましくは2～7.5、より好ましくは5～7である。例えば、ホエイからラクトフェリンを分離精製する場合、ホエイのpHは約6であるため、水性溶液のpHの調節を必要としない点で好適である。pHの調節は、例えば、水酸化ナトリウム水溶液、希塩酸、リン酸、酢酸、コハク酸、クエン酸などの当業者が通常用いるpH調整剤を添加することによって行われる。

上記陽イオン性タンパク質含有水性溶液の塩濃度は、該水性溶液の種類によって異なるが、通常、該水性溶液中に、灰分として好ましくは0.01質量%～5質量%、より好ましくは0.01質量%～1質量%である。例えば、新鮮なホエイは、灰分を0.4質量%～0.5質量%含有し、その中で、ナ

トリウムが0.03～0.05質量%、カリウムが0.12～0.16質量%、マグネシウムが0.02～0.03質量%、およびリンが0.03～0.05質量%であり得る。生乳は、灰分を約0.7質量%含有し、その中で、ナトリウムが約0.05質量%、カリウムが約0.15質量%、マグネシウムが約0.01質量%、およびリンが約0.09質量%であり得る。陽イオン性タンパク質の効率的分離のためには、塩濃度は高いことが望ましく、次の工程である脱塩処理のためには、塩濃度は低いことが望ましい。

陽イオン性タンパク質含有水性溶液中の陽イオン性タンパク質濃度は特に限定されない。例えば、ホエイは、通常、ラクトフェリンを約100mg/L含む。

(電気透析装置)

本発明の方法に用いられる電気透析装置は、陽極と陰極とを有する電気透析槽を備え、該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜（陰イオン交換膜）で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜（陽イオン交換膜）で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。

陰イオン交換基を導入した多孔性膜（陰イオン交換膜）は、陰イオン交換基が導入され、陰イオンを選択的に透過する機能を有する多孔性膜であり、導入される陰イオン交換基の種類は特に限定されない。例えば、アンモニウム基、スルホニウム基、ホスホニウム基などが導入された強塩基性陰イオン交換膜、第1級アミノ基～第3級アミノ基が導入された弱塩基性陰イオン交換膜などが挙げられる。このような陰イオン交換膜は、多数市販されており、容易に入手可能である。

陰イオン交換膜の孔径は、特に限定されないが、含有される主な陰イオン性タンパク質が透過できるように、その大きさに応じて適宜設定すればよい。

通常、 $0.1\text{ nm} \sim 1\text{ nm}$ である。

陽イオン交換基を導入した多孔性膜（陽イオン交換膜）は、陽イオン交換基が導入され、陽イオンを選択的に透過する機能を有する多孔性膜であり、導入される陽イオン交換基の種類は特に限定されない。例えば、スルホン酸基、ホスホン酸基、硫酸エステル基、リン酸エステル基などの陽イオン交換基を有する強酸性陽イオン交換膜、カルボン酸基、フェノール性水酸基などの陽イオン交換基を有する弱酸性陽イオン交換膜などが挙げられる。さらに、膜の種類についても特に制限されず、例えば、濾紙膜、石油系高分子膜（ポリビニルアルコール膜）、不織布などを使用することができる。

陽イオン交換膜の孔径は、目的の陽イオン性タンパク質の大きさ、および膜の種類に応じて適宜設定すればよい。例えば、陽イオン性タンパク質がラクトフェリンである場合、通常、孔径は、約 $0.1\text{ }\mu\text{m} \sim 50\text{ }\mu\text{m}$ である。特に、陽イオン交換膜として濾紙膜を使用する場合は、約 $1\text{ }\mu\text{m} \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ が好ましい。陽イオン交換膜の厚みおよび交換容量についても特に制限はない。厚みは、通常、 $20\text{ }\mu\text{m} \sim 2\text{ mm}$ 程度である。交換容量は、例えば、濾紙膜の場合、 0.1 meq/g 乾燥膜 $\sim 0.5\text{ meq/g}$ 乾燥膜程度、石油系高分子膜の場合、 0.1 meq/g 乾燥膜 $\sim 4\text{ meq/g}$ 乾燥膜程度が好ましい。ポリビニルアルコール膜の場合は含水量が多いため、湿潤膜当たりで交換容量が示され得、好ましくは 0.5 meq/g 湿潤膜 $\sim 2.0\text{ meq/g}$ 湿潤膜程度である。不織布の場合、 2 meq/g 乾燥膜 $\sim 4\text{ meq/g}$ 乾燥膜程度である。また、陽イオン交換膜は、必要に応じて、複数枚を重ね合わせて使用してもよい。

陽イオン交換膜は、多数報告されており、容易に入手可能である。例えば、株式会社ニチビのIEF-SC（スルホン酸タイプ）あるいはIEF-WC（カルボン酸タイプ）などを用いて織られた不織布、イオン交換繊維を濾紙状に成型したイオン交換膜（RX-1；東レ）などが挙げられる。あるいは、

陽イオン交換膜は、紙漉き法（湿式法）およびキャスト法などによっても得られる。導入される交換基が多い点で、キャスト法で得られる陽イオン交換膜が好ましく、耐久性が高い点では、紙漉き法よって得られる陽イオン交換膜が好ましい。

- 5 紙漉き法は、例えば、陽イオン交換基を導入した膜素材を水中に分散させ、この膜素材を保持体上に漉くことによって行われる。

膜素材としては、高純度高結晶セルロース（固体構造が多結晶セルロース I ～ I V のいずれでもよい）などのセルロース、キチン、キトサンなどが挙げられる。さらにセルロースが束になった漂白化学パルプ（長繊維パルプ）、
10 綿リントーパーパルプなども用いられ得る。好ましくはセルロースおよび長繊維パルプである。

保持体は、一般に、50 ～ 400 メッシュ程度の網目状のものが用いられる。保持体の素材としては、例えば、有機繊維、無機繊維、および金属繊維いずれも用いることができる。

- 15 有機繊維としては、レーヨン、キュプラ、アセテート、ビニロン、ナイロン、ビニリデン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、アクリル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリクラールなどが挙げられる。好ましくはナイロンが用いられる。無機繊維としては、ガラス繊維、石英繊維、シリカ・アルミナ繊維、ロックウール、リン酸カルシウム繊維、チラノ繊維、シリカ繊維、炭化
20 ケイ素繊維、アルミナ繊維、ジルコニア繊維、活性炭素繊維、炭素繊維、気相法炭素繊維、炭化ケイ素ウイスカ、窒化ケイ素ウイスカ、アルミナウイスカ、グラファイトウイスカ、チタン酸カリウム繊維、セッコウウイスカ、フ
 ォスフェートウイスカ、マグネシウムウイスカ、オキシ硫酸マグネシウム、
 マグネシウムパイロボレート、石綿、ワラスナイトなどが挙げられる。金属
25 繊維としては、ステンレス鋼繊維、アルミ繊維、Al-Mg 繊維、Al-Si 繊維などが挙げられる。機械的強度が高い点でセラミックス膜、ステンレ

スペースのチタン膜などが使用可能である。

キャスト法は、例えば、ポリマーをキャスト板などに流し込み、膜状に成形した後、架橋により該ポリマーに陽イオン交換基を導入することによって行われる。

- 5 キャスト法において、膜素材であるポリマーとしては、例えば、ポリビニルアルコール（PVA）が挙げられる。膜の耐久性を向上させるために、耐熱性および耐酸化性が良好な含フッ素ポリマーも好適に用いられる。

- 10 陽イオン交換膜は、片面を予め陰イオン交換膜で被膜してもよい。この被膜した面を電気透析槽の原料投入室側に設置することによって、水性溶液中の陽イオン（金属イオン）が陽イオン性タンパク質よりも膜を通過しにくくなるため、精製効率が上昇し得る。さらに、被膜を交換することによって膜の劣化を防止し、電流効率が悪くなることを防ぐことができる。被膜は、陽イオン交換膜の表面に陰イオン交換膜を貼りつけること、あるいは陰イオン交換基を有する高分子物質を含有する溶液を塗布することによって行われ得る。
- 15

- 微細孔膜は、目的の陽イオン性タンパク質を透過せず、かつ陽イオン（金属イオン）またはより小さい分子サイズのタンパク質を透過させる孔径を有する膜であれば、特に制限はない。このような微細孔膜としては、例えば、限外濾過膜および微細孔陽イオン交換膜が挙げられる。孔径は、通常、2 nm
- 20 m～200 nm、好ましくは2 nm～20 nmである。

- 本発明に用いる電気透析装置は、上記のように、電気透析槽を備え、該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室で構成され、該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られている。電気透析槽の大きさは、処理量に応じて適宜設定すればよく、特に制限
- 25

されない。電気透析槽の材質についても特に制限はない。通常、アクリル、ステンレスなどである。

(電解質溶液)

電解質溶液は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの当業者が通常用いる電解質の水溶液であれば、特に制限はない。電解質溶液の濃度についても特に制限はない。好ましくは $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \sim 1 \text{ mol/dm}^3$ である。電解質の濃度が高いほど、電流効率はよくなるが、陽イオン性タンパク質精製物中に塩類が含有されることになるため、注意を要する。電解質溶液の pH は、2～8 が好ましい。

(陰イオン交換体およびキレート化剤)

本発明の方法では、必要に応じて、陰イオン交換体またはキレート化剤を用いてもよい。具体的には、原料投入室に、陰イオン交換体またはキレート化剤を添加する。陰イオン交換体を添加する場合、該陰イオン交換体に陰イオン性タンパク質および陰イオンが吸着されるため、膜への陰イオン性タンパク質の付着を防止でき、かつ陰イオンが交換されるため、電流効率を高く保持することができる。陰イオン交換体としては、当業者が通常用いる陰イオン交換性を有する物質であれば、特に制限はない。例えば、上記の陰イオン交換基が導入された陰イオン交換樹脂粒子、陰イオン交換セルロース、陰イオン交換セラミックスなどが挙げられる。キレート化剤を添加する場合、該キレート化剤に陽イオン（金属イオン）が吸着されるため、陽イオン性タンパク質含有水溶液中の陽イオン（金属イオン）が減少し、陽イオン性タンパク質の膜透過効率が上昇する。キレート化剤としては、例えば、EDTA などのポリアミノカルボン酸塩、クエン酸などのオキシカルボン酸類、それらの縮合リン酸塩、高分子キレート化剤、およびこれらの複合体などが挙げられる。

(陽イオン性タンパク質の分離精製方法)

本発明の陽イオン性タンパク質の分離精製方法では、まず、電気透析槽の原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を、そして陽極室、濃縮室、および陰極室に電解質溶液を投入する。陽極室、濃縮室、および陰極室には、
5 それぞれ同一の電解質溶液、あるいは異なる電解質溶液を投入し得る。陽イオン性タンパク質および電解質溶液の量は、電気透析槽の大きさに応じて設定すればよく、特に制限されない。このとき、上記の陰イオン交換体またはキレート化剤を投入してもよい。陰イオン交換体またはキレート化剤の投入量は、特に制限されない。通常、陽イオン性タンパク質水性溶液 100 質量部
10 に対して 1 質量部～5 質量部の割合で投入され得る。

次いで、電気透析装置に電流を負荷する。負荷電流の電流密度は、電気透析槽の大きさなどに応じて設定すればよく、特に制限されない。陽イオン性タンパク質を変性させずに分離精製する点で、負荷電流の電流密度はあまり
15 高くないことが好ましく、例えば、 $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である。その他の電気透析条件に特に制限はない。例えば、溶液温度は、通常 $4^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 、好ましくは室温に保持され得る。

上記のように電気透析装置に電流を負荷することによって、原料投入室に存在する目的の陽イオン性タンパク質および陽イオン（金属イオン）が陽イオン交換膜を透過して濃縮室に移行する。一方、陰イオン性タンパク質および陰イオンが陰イオン交換膜を透過して陽極室に移行する。濃縮室に移行された陽イオン性タンパク質と陽イオンのうち、分子サイズが小さい陽イオン性タンパク質と陽イオンとは微細孔膜を透過して陰極室に移行する。その結果、微細孔膜の孔径よりも分子サイズが大きい陽イオン性タンパク質が濃縮室中に濃縮される。このように、本発明の方法では、目的の陽イオン性タン
20 パク質、好ましくはラクトフェリンを変性させることなく、電気透析する工程のみで簡便に分離精製することができる。

このようにして得られた濃縮室中の陽イオン性タンパク質を含有する溶液は、さらに、当業者が通常用いる手段によって処理してもよい。例えば、陽イオン性タンパク質がラクトフェリンの場合、鉄を遊離させたアポラクトフェリンは、抗菌作用を発揮する。したがって、該溶液に含まれるラクトフェリンから鉄を遊離させるために、回収した溶液のpHを1～3に調節することが好ましい。pH調整剤としては、例えば、塩酸、リン酸、フタル酸、グリシンなどが用いられる。あるいは、当業者が通常用いる手段によってさらに精製され得る。

上記濃縮室中の溶液は、目的の陽イオン性タンパク質を高い割合で含有する。例えば、上記電気透析装置を用いてホエイからラクトフェリンを抽出する場合、上記濃縮室の溶液中に含まれる全タンパク質中のラクトフェリンの割合は非常に高く、全タンパク質の好ましくは70質量%以上、より好ましくは95質量%以上である。なお、ラクトフェリンは、抗ラクトフェリン抗体による免疫化学的方法、HPLC、SDS-PAGEなどを用いて測定される。上記濃縮室中の溶液に含まれる陽イオン性タンパク質は、その後、当業者が通常行う濃縮、乾燥、および粉末化などの処理を経て製剤化され得る。

本発明の方法によって得られた陽イオン性タンパク質は、食品、医薬品、化粧品などの原料として種々の分野で使用する事ができる。

(実施例)

(製造例1：陽イオン交換膜の製造)

長繊維パルプ20gとクロロアセチルクロライド200gとを混合し、この混合液に、さらにトリエチルアミン4gを添加し、80℃にて12時間還流した。次いで、この反応混合液（水酸基の一部がクロロアセチル化した長繊維パルプを含む）と濃硫酸とを容量比で25：1で混合し、還流しながら30℃にて12時間保持し、アセチル基をスルホン化した。得られたスルホ

ン基を有する長繊維パルプを回収し、エタノール／メタノール（容量比で 1 : 1）混液、塩酸、および水で洗浄した。洗浄後、この長繊維パルプを繊維が十分絡み合うように叩解し、水中に分散させ、100メッシュのナイロンで漉き、濾紙状に成形した。得られたスルホン基を導入した濾紙状物を不
5 織布の間に挟み、ローラーで加圧した後、60℃のオーブンにて自由水を除去して陽イオン交換膜（濾紙膜）を得た。この陽イオン交換膜は、孔径が1 μm ~ 5 μm 、厚みが0.3mm、および交換容量が0.28 meq / g 乾燥膜であった。なお、孔径は、種々の粒径を有する粒子について、得られた濾紙膜を透過し得た粒子を光学顕微鏡で観察したときの最大粒子径である。

10 （製造例2：陽イオン交換膜の製造）

50mLのイオン交換水に、3.5gのポリビニルアルコール（PVA）および0.19gの2-アミノピリジン（2-AP）を添加して90℃にて90分間加熱攪拌してPVAを溶解させた。次いで、このPVA溶液を十分に冷却し、キャスト板に流し込み、ホットプレート上で50℃にて約6時間
15 乾燥させた。得られたPVA膜を2Nの塩化ナトリウム水溶液に浸漬させ、25℃にて24時間保持した。これとは別に、0.8mLのグルタルアルデヒド（GA）および1.73mLの11.6Nの塩酸水溶液を、2Nの塩化ナトリウム水溶液で全体容量が200mLとなるようにGA溶液を調製した。このGA溶液に、上述の浸漬後のPVA膜を移して浸漬させ、25℃にて2
20 4時間保持した。さらにイオン交換水に浸漬させ、イオン交換水を毎日交換しながら5日間以上保持した。このようにして得られた陽イオン交換膜は、厚みが0.4~0.8mm、および交換容量が0.5 meq / g 湿潤膜~ 2 meq / g 湿潤膜であった。

（実施例1）

25 電気透析装置を以下のようにして準備した。まず、アクリル樹脂製の電気透析装置を作製し、その電気透析槽内を陽極側から順に、陽極室、原料投入

室、濃縮室、および陰極室で構成されるように仕切った。すなわち、陽極室と原料投入室とを陰イオン交換膜（AM-1、株式会社トクヤマ）で仕切り、原料投入室と濃縮室とを上記製造例1で得た陽イオン交換膜で仕切り、および濃縮室と陰極室とを微細孔陽イオン交換膜（CM-1、株式会社トクヤマ）で仕切った。

低温殺菌牛乳（40 g）に、 $100\text{ }\mu\text{g/g}$ となるようにウシラクトフェリン（シグマ社）を溶解した。このラクトフェリン含有牛乳を、上記電気透析装置の原料投入室に投入し、一方、陽極室、濃縮室、および陰極室に、 $\text{pH}7.0$ 、 1 M NaCl 水溶液を投入した。電気透析装置に 1 mA/cm^2 の電流を20分間負荷させた。電流負荷後、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室中の溶液を回収し、それぞれ陽極室溶液、原料投入室溶液、濃縮室溶液、および陰極室溶液とした。

上記の各室の溶液中のラクトフェリンを非還元条件下でSDS-PAGEにより確認した。得られた各室の溶液を $10\text{ }\mu\text{L}$ ずつ、それぞれ2つのLaneに注入した（Lane 3および4：陰極室溶液、Lane 5および6：濃縮室溶液、Lane 7および8：原料投入室溶液、Lane 9および10：陽極室溶液）。なお、比較として、ウシラクトフェリンを $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含有する水溶液（Lane 1および2）および原料である低温殺菌牛乳（Lane 11および12）をそれぞれ、 $5\text{ }\mu\text{L}$ （上記溶液の $1/2$ 量）注入した。結果を図2に示す。

図2に示すように、原料である低温殺菌牛乳では、ラクトフェリンのバンドおよびその他のタンパク質のバンドが検出されたのに対して、濃縮室の溶液では、ラクトフェリンのバンドのみが検出された。また、陽極室の溶液および陰極室の溶液には、ラクトフェリンのバンドは、検出されなかった。これらのことは、上記の電気透析装置を用いることによって、陽イオン性タンパク質を分離精製することができることを示す。

さらに、得られた濃縮室溶液 10 mL に、5 mM の NTA（ニトリロトリ
アセテート）を含有する溶液および 5 mM の FeCl_3 を含有する溶液をそ
れぞれ 50 μL ずつ加えて混合した。その結果、ラクトフェリンの鉄結合性
の指標である 280 nm と 460 nm との吸収の比が段階的に増加すること
5 が明らかとなった。このことは、濃縮室溶液中のラクトフェリンが正常に鉄
結合能力を有することを示す。したがって、ラクトフェリンが変性せずに抽
出されていると考えられる。

（実施例 2）

低温殺菌牛乳の代わりに、チーズホエイ（四葉乳業）を用いたこと以外は、
10 実施例 1 と同様にして、電気透析装置に電流を負荷させた。実施例 1 と同様
にして、得られた各室の溶液中のラクトフェリンを SDS-PAGE にて確
認したところ、実施例 1 と同様に、原料であるチーズホエイでは、ラクトフ
ェリンのバンドおよびその他のタンパク質のバンドが検出されたのに対して、
濃縮室の溶液では、ラクトフェリンのバンドのみが検出された。また、陽極
15 室の溶液および陰極室の溶液には、ラクトフェリンのバンドは、検出されな
かった。

（比較例 1）

実施例 1 で用いた陽イオン交換膜の代わりに、微細孔陽イオン交換膜であ
る石油系高分子膜（CM-1、株式会社トクヤマ）を用いたこと以外は、実
20 施例 1 と同様にして、電気透析装置にラクトフェリン含有牛乳を投入し、電
流を負荷させた。実施例 1 と同様にして、得られた各室の溶液中のラクトフ
ェリンを SDS-PAGE にて確認したところ、原料投入室溶液のみでラク
トフェリンのバンドが検出された。このことは、ラクトフェリンが、石油系
高分子膜に透過しないことを示す。

（比較例 2）

実施例 1 で用いた陽イオン交換膜の代わりに、微細孔陽イオン交換膜であ

る石油系高分子膜（CM-2、株式会社トクヤマ）を用いたこと以外は、実施例1と同様にして、電気透析装置にラクトフェリン含有牛乳を投入し、電流を負荷させた。実施例1と同様にして、得られた各室の溶液中のラクトフェリンをSDS-PAGEにて確認したところ、比較例1と同様、原料投入室溶液のみでラクトフェリンのバンドが検出された。

（実施例3）

卓上式電気透析装置（マイクロアシライザーS3；株式会社アストム製）を準備し、その膜ユニット間に、陽イオン交換膜（RX-1；東レ）を10枚積層して装着した（通電面積 55 cm^2 ；有効膜面積 550 cm^2 ）（図3参照）。陽極室、濃縮室、および陰極室に、pH7の0.1M NaCl水溶液を投入した。チーズホエイ（ラクトフェリン含有量 105 mg/L ）1Lを、 5 mA/cm^2 となるように通電しながら、ポンプ循環した。一方、ラクトフェリン濃縮相もポンプ循環させた。この時、ホエイ送液速度とラクトフェリン濃縮相送液速度とを変化させて、その差が-50、-40、-30、-20、-10、-5、0、5、10、20、30、40、および50 mL/分となるように試験を行った。各送液速度差での稼働後30分の時点で、ラクトフェリン濃縮相からサンプル抽出を行い、ELISA法（Quantitation kit；Bethyl Laboratory, TX）によってラクトフェリンを定量した。総タンパク量はLowry法によって決定した。収率（%）は、（ラクトフェリン濃縮相のラクトフェリン量）／（ホエイのラクトフェリン量）×100で表し、純度（%）は、（ラクトフェリン濃縮相のラクトフェリン量）／（ラクトフェリン濃縮相の総タンパク量）×100で表した。結果を図4に示す。同時に、HPLCによって、ホエイおよび処理後のラクトフェリン濃縮相液のタンパク質を測定した（図5）。HPLCの測定条件は、以下のとおりであった。

カラム：CAPCELL PAK C₈ SG300 S5（資生堂）

移動相：(A) $\text{CH}_3\text{CN}/0.5\text{M NaCl}/\text{トリフルオロ酢酸}=50/450/0.15(\text{v/v/v})$

(B) $\text{CH}_3\text{CN}/0.5\text{M NaCl}/\text{トリフルオロ酢酸}=500/450/0.3(\text{v/v/v})$

A/B (v/v) : 50/50 \rightarrow 10/90 (20分) グラジエント

流速：0.8 mL/分

5 検出：UV検出 (280 nm)

図4に示すように、最も収率が高い条件である（ホエイ送液速度）—（ラクトフェリン濃縮相送液速度）= 50 mL/分の場合（このときのホエイの送液速度は1200 mL/分）、ホエイのポンプ送液の圧力によってラクトフェリン以外のタンパク質の圧浸透が見られた。ラクトフェリン収率が90%以上の場合にはいずれも、純度は31%以下であった。このため、ラクトフェリン濃縮相の相対送液速度を上げることによって、圧浸透を起こさないようにした。その結果、収率は64%と低くなったが、純度は95%以上に上昇した。また、図5に示すように、送液速度差が-5 mL/分の場合のHPLCによる分析においても、純度の高いラクトフェリンが得られたことを確認した。

10

15

産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、陽イオン性タンパク質を、変性させることなく、電気透析する工程のみで簡便に分離精製することができる。本発明によって得られた陽イオン性タンパク質、好ましくはラクトフェリンは、食品、医薬品、化粧品などの原料としての使用に好適である。

20

請求の範囲

1. 電気透析装置を用いて、陽イオン性タンパク質を分離精製する方法であって、

- 5 該電気透析装置が、陽極と陰極と有する電気透析槽を備え、そして該電気透析槽が、該陽極側から順に、陽極室、原料投入室、濃縮室、および陰極室を備え、

 該陽極室と該原料投入室とが陰イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、

- 10 該原料投入室と該濃縮室とが陽イオン交換基を導入した多孔性膜で仕切られ、そして

 該濃縮室と該陰極室とが微細孔膜で仕切られており、そして該方法が、

 (1) 該原料投入室に陽イオン性タンパク質含有水性溶液を投入し、該陽極室、該濃縮室、および該陰極室に電解質溶液を投入する工程、

- 15 (2) 該電気透析装置に電流を負荷する工程、および

 (3) 該濃縮室から陽イオン性タンパク質を含有する溶液を回収する工程を包含する、方法。

- 20 2. 前記陽イオン性タンパク質が、ラクトフェリンである、請求項1に記載の方法。

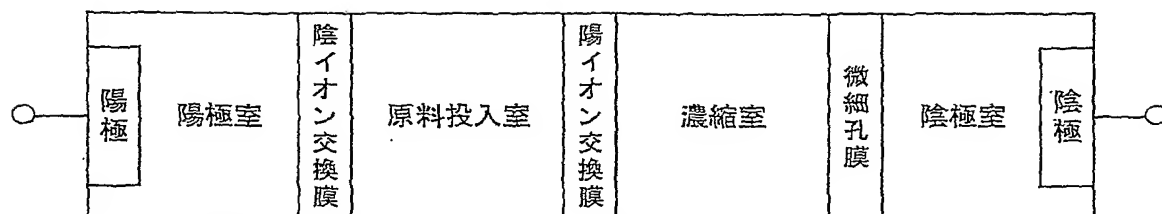
 3. 前記電流の電流密度が $0.1 \sim 50 \text{ mA/cm}^2$ である、請求項1または2に記載の方法。

- 25 4. 前記(1)の工程において、前記原料投入室にさらに陰イオン交換体またはキレート化剤が添加される、請求項1～3のいずれかの項に記載の方法。

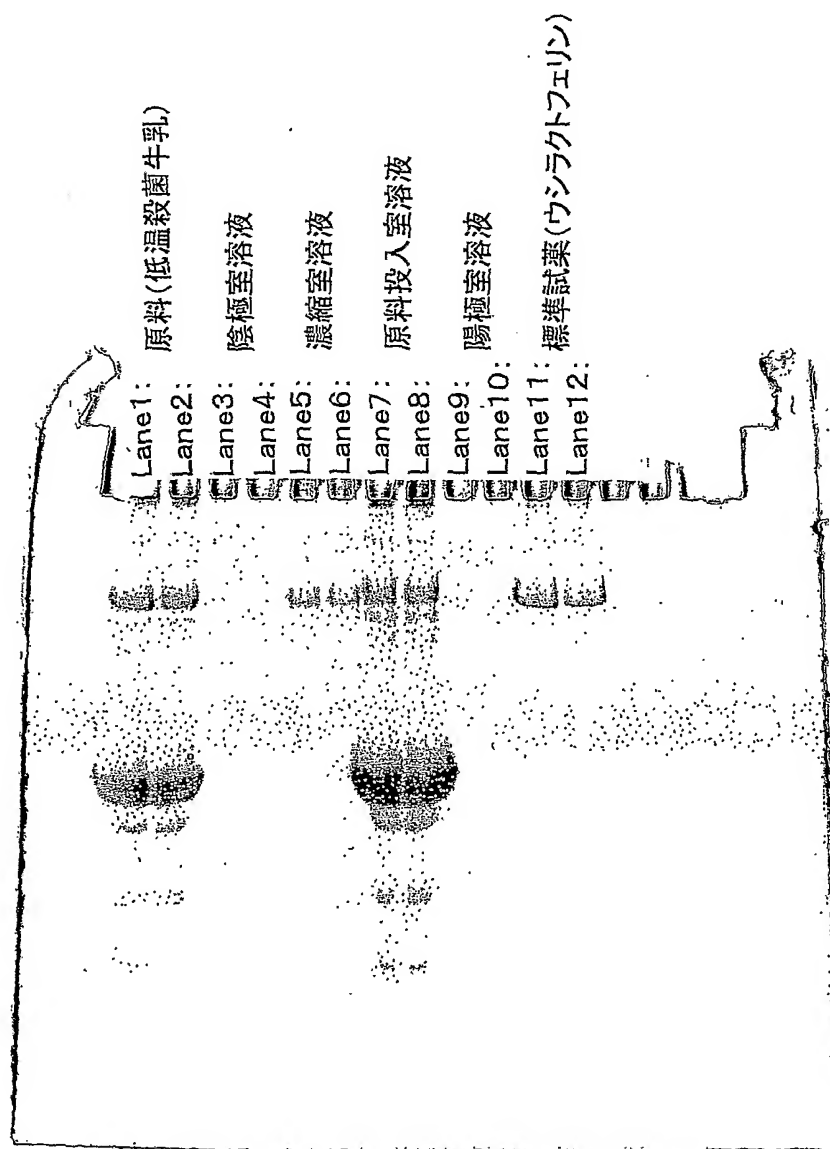
5. 前記陽イオン交換膜の原料投入室側の面が、陰イオン交換膜で被膜されている、請求項1～4のいずれかの項に記載の方法。

1 / 3

第1図

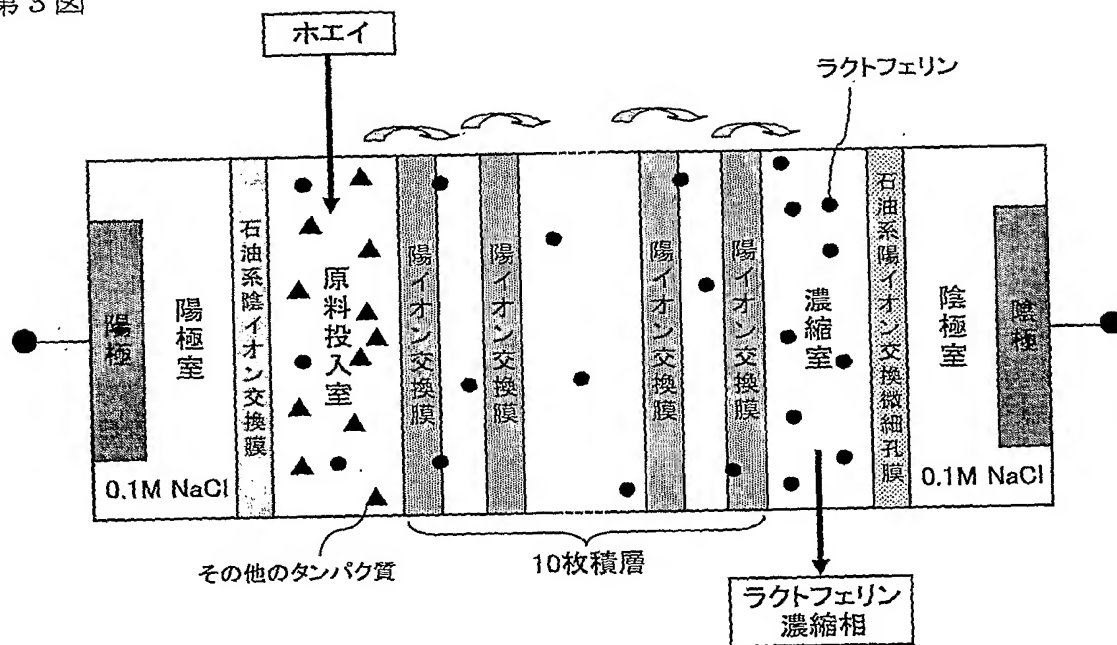


第2図

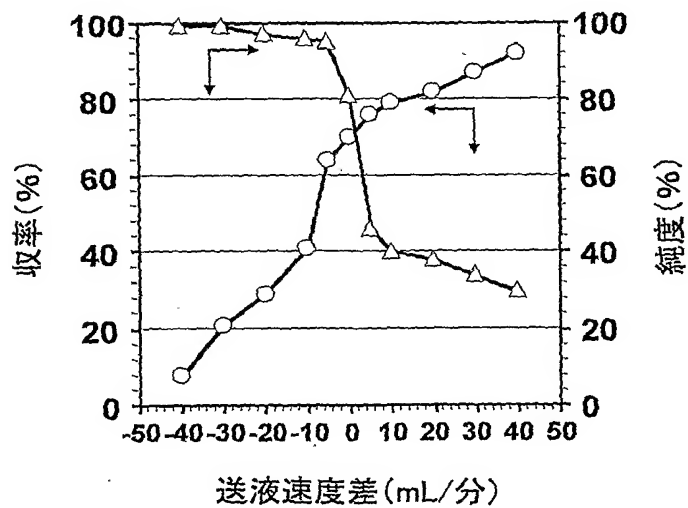


2 / 3

第3図



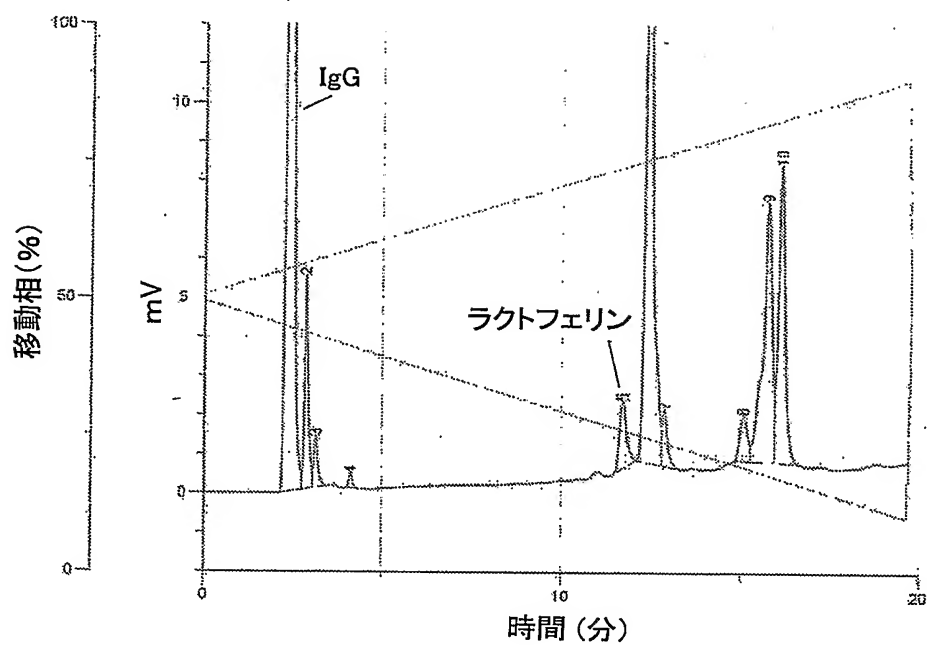
第4図



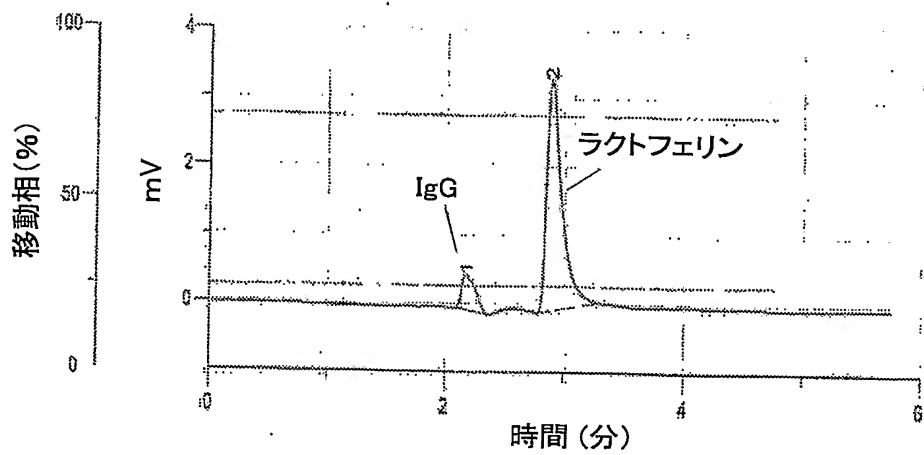
3 / 3

第5図

チーズホエイ



抽出操作後



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K1/24, C07K14/79, A23J1/20, A23J3/08, B01D61/46, C02F1/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/24, C07K14/79, A23J1/20, A23J3/08, B01D61/46, C02F1/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chiu, Clovis K. ; Etzel, Mark R., Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane, Journal of Food Science (1997), 62(5), 996-1000	1-5
A	TOMITA, Mamoru Membrane separation in dairy industry, Foods & Food Ingredients Journal of Japan (1999), 181, 33-41	1-5
A	JP 2002-84984 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 26 March, 2002 (26.03.02), Full text (Family: none)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 February, 2005 (17.02.05)

Date of mailing of the international search report
08 March, 2005 (08.03.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C07K 1/24 C07K 14/79 A23J 1/20 A23J 3/08 B01D 61/46 C02F 1/46

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl7 C07K 1/24 C07K 14/79 A23J 1/20 A23J 3/08 B01D 61/46 C02F 1/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Chiu, Clovis K.; Etzel, Mark R., Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane, Journal of Food Science (1997), 62(5), 996-1000	1-5
A	Tomita, Mamoru Membrane separation in dairy industry, Foods & Food Ingredients Journal of Japan (1999), 181, 33-41	1-5
A	JP 2002-84984 A (明治乳業株式会社) 2002.03.26, 文献全体 (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.02.2005

国際調査報告の発送日

08.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4B

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3448